

また、ヒアルロン酸は生体内に存在し、皮膚疾患をはじめ多くの臓器に使用されている。内耳にも人工内耳埋め込み術の際に潤滑油としてヒアルロン酸は使用されている。

3. その他  
なし

## 結論

内耳薬物動態の基礎研究によって徐放剤の効果を示すことが可能になった。生体物質に親和性のある徐放剤には臨床の利点があることから臨床応用される薬剤として検討中である。

## 健康危険情報

特になし

## 研究発表

### 1. 論文発表

Kanzaki S, Fujioka M, Yasuda A, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Ogawa K, Okano H. Novel in vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery system in mice: comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections. PLoS One 2012;7(12):e48480

### 2. 学会発表

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

未定

### 2. 実用新案登録

未定

## 骨髄幹細胞投与による虚血性内耳障害の治療-その①

分担研究者：暁 清文（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

共同研究者：高木太郎（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

共同研究者：羽藤直人（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

共同研究者：白馬伸洋（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

共同研究者：岡田昌浩（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

### 研究要旨

一過性内耳虚血を負荷したスナネズミに骨髄幹細胞（造血幹細胞）を投与し、その内耳障害防御効果や再生効果を検証した。虚血 24 時間後に骨髄幹細胞を投与した動物の ABR 閾値は、未投与のコントロール群と変わらず、聴力改善効果は見られなかった。しかし組織学的には骨髄幹細胞は modiolus の血管内やその周囲に認められた。今後、骨髄幹細胞の投与量や投与時期を検討し、この治療法の効果を確認する予定である。

### 研究目的

末梢血中の骨髄由来幹細胞（CD34 陽性細胞）は造血系起源細胞であるだけでなく、①虚血障害部位で血管新生因子を放出する、②障害された血管内皮を修復する、などの効果を有している。したがって骨髄由来幹細胞が減少すると、血管新生が妨げられ脳機能や神経機能は低下する。すでに中大脳動脈閉塞の動物実験で、骨髄由来幹細胞の静注は虚血性脳萎縮を防御する効果があることが報告されている。そこで本研究では骨髄由来幹細胞を取り出し、一過性内耳虚血の動物モデルに静注し、その聴力や内耳組織への影響を検討することにした。

愛媛大学では以前に一過性内耳虚血の動物モデル（スナネズミ）を用いて、骨髄幹細胞の蝸牛内投与の効果を検証したことがある。その結果、一過性虚血は内耳にアポトーシスを誘導し、有毛細胞やラセン神経節細胞の変性をきたし、不可

逆的な難聴を引き起こす。その際、虚血前に骨髄幹細胞を投与しておくこと、これが神経栄養因子を分泌して内耳障害を防御することを報告した。しかし急性高度難聴患者の治療を考えた場合、骨髄幹細胞の蝸牛内投与はむしろ内耳障害を悪化させる可能性があり、臨床的に実施するには問題がある。そこで今回、動物モデルを用いて骨髄幹細胞の静脈内投与を行い、その効果を ABR や組織学的手法で検討することにした。

### 研究方法

#### 1. 実験動物

ドナーには 8～12 週齢のスナネズミを、レシピエントには一過性内耳虚血を惹起した 8～12 週齢のスナネズミを用いた。一過性内耳虚血の誘導は全身麻酔後、15 分間の両側椎骨動脈の血流遮断を行うことで負荷した。

## 2. 骨髄幹細胞の採取・染色と投与

ドナーから採取した大腿骨および脛骨より、骨髄幹細胞を分離抽出し、一匹あたり約 4 万～5 万個の骨髄細胞を得ることができた。得られた骨髄幹細胞を緑色の蛍光色素 PKH67 にて染色した。ここまでの操作に要する時間は約 2 時間であった。レシピエントに一過性内耳虚血を负荷した 24 時間後に、骨髄幹細胞 (PKH 陽性細胞) を大腿静脈に静注した。なお今回の実験は homograft になるが、放射線照射や免疫抑制剤は使用しなかった。

## 3. ABR の測定

ABR は虚血前、虚血 1 日後、4 日後、7 日後に測定した。刺激音は 8kHz のトーンバーストを用い、300 回の加算を行い、10dB ステップで刺激音圧を変化させた。閾値付近では 5dB ステップで変化させて聴力閾値を求めた。

## 4. 骨髄幹細胞の局在の確認

虚血負荷後、7 日目に 4%paraformaldehyde (PFA) 液にて全身灌流固定を行い、蝸牛を採取した。採取標本は PFA 液にて浸漬固定後、0.1M EDTA 液で脱灰し、OCT compound に凍結包埋を行った。これをクライオスタットにて薄切し 10  $\mu$ m の切片を作製し、蛍光顕微鏡にて観察した。

## 結果

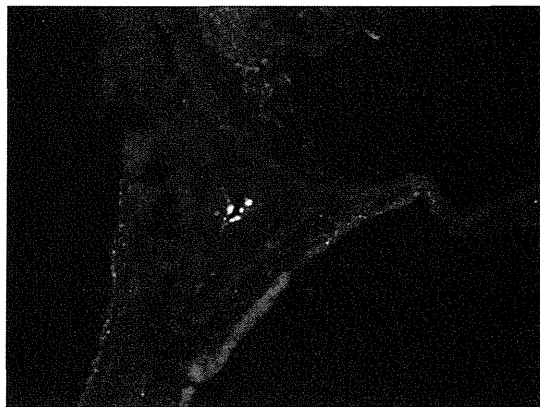
### 1. ABR 閾値の変化 (図 1)

図 1 に虚血前後の ABR 閾値の経時的推移を示す。虚血後、ABR 閾値は著明に上昇するが、7 日目には 33dB 程度にまで改善した。ABR 閾値は骨髄幹細胞を静注した群としない群で差はなく、骨髄幹細胞の静

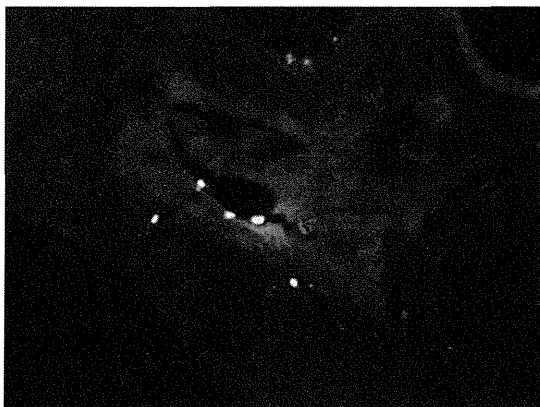
注は聴力に影響しないことが示された。

### 2. 骨髄幹細胞の局在の確認 (図 2 a, b)

採取した蝸牛組織を蛍光顕微鏡で観察すると、PKH67 で緑色に染色された骨髄幹細胞が modiolus の血管内に認められた (図 2a)。また、一部では血管から周囲に浸潤している所見も認められた (図 2b)。



(図 2a)



(図 2b)

## 考察

一般に幹細胞は胚性幹細胞 (ES 細胞) と組織特異的幹細胞に分類される。前者は胎児から採取するため倫理的問題があり、臨床研究には適さない。後者は成人では多くの臓器に存在が確認されており、倫理的問題はない。特に骨髄幹細胞は骨髄より比較的容易に採取・分離ができ、

自己組織を用いては倫理面だけでなく移植免疫などの問題もないため、臨床応用に適した供給源と考えられる。

骨髄幹細胞は自己増殖能と多分化能を持ち、多種多様な組織や臓器になりうる細胞であることから、不可逆的障害を受けた組織・臓器を再生させる効果が期待できる。幹細胞の効果については、内耳前駆細胞や胚性幹細胞、神経幹細胞を用いた内耳再生の研究が進められ、すでに動物実験段階で一定の成果が報告されている。最近の研究によると、障害局所に投与した幹細胞は、死滅した神経細胞と置き換わり機能を代行するだけでなく、神経栄養因子を分泌して障害進行を抑制する効果もあることが分かっている。従って障害急性期に骨髄幹細胞を投与すると、神経栄養因子の合成促進を介して内耳障害防御に働くものと推察される。

今回の実験では虚血の24時間後に骨髄幹細胞の投与を行ったためか、虚血による内耳障害を防御する効果は認められなかった。しかし組織学的に骨髄幹細胞は内耳に移行していた。Blood labyrinthine barrier は虚血時に通過し易くなると推察されるので、今後、虚血直前あるいは虚血直後に骨髄幹細胞を静注し、効果を

確かめる予定である。

## 結論

一過性内耳虚血の24時間後に骨髄幹細胞を投与したところ、ABR 閾値の改善は見られなかった。今後、虚血負荷と骨髄幹細胞投与のタイミングを調節し、骨髄幹細胞投与で効率よく内耳障害を防御する手段を探求したいと考えている。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

1. 論文発表  
未発表
2. 学会発表  
未発表

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

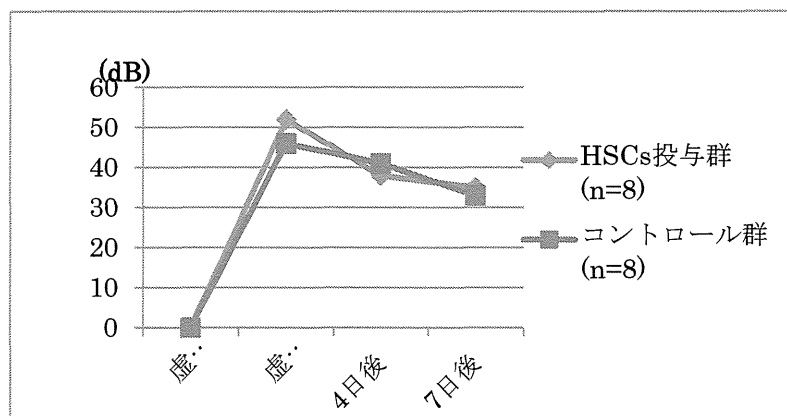
実用新案登録

なし

その他

なし

図1 ABR 閾値の経時的推移



## 急性感音難聴発症時の蝸牛における MAP キナーゼ発現の経時的解析に関する研究

分担研究者：福島邦博（岡山大学耳鼻咽喉科講師）

共同研究者：前田幸英（岡山大学耳鼻咽喉科助教）

### 研究要旨

現在開発中の急性感音難聴治療薬の標的分子である MAP キナーゼ群が、急性感音難聴発症時の蝸牛において、どの様な時間経過で活性化しているか明らかにした。

#### 研究目的

MAP キナーゼ群は MEK1/ ERK1/2 /p90 RSK, JNK/c-Jun, p38 MAPK カスケードからなるシグナル蛋白で、アポトーシスを引き起こすことによって感音難聴の発症に関与することが知られている。このため、JNK, p38 MAPK 阻害薬は急性感音難聴治療薬として現在研究が進んでいる。より適切な治療モデルの構築のために、これらの蛋白が急性感音難聴の発症時にどの様な時間経過で活性化されるか、またその際リン酸化のみにより活性化されるのか、蛋白合成を伴うのかを明らかにした。

#### 研究方法

マウスを 120dB オクターブバンドノイズに 2 時間暴露し、難聴を発症することを聴性脳幹反応で確認した。暴露前、直後、3, 6, 12, 24, 48 時間後に蝸牛を切りだし ( $n=8$ )、蛋白を抽出して Bio-Plex Suspension Array System で Phospho- および Total- MEK1, ERK1/2, p90 RSK, JNK, c-Jun, p38 MAPK を定量した。JNK, p90 RSK, p38 MAPK については発現量が最大となる時点で免疫染色により蝸牛内での発現部位を検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認のもとに行い、動物実験は十分な麻酔下に苦痛を最小限としておこなった。

#### 研究結果

騒音暴露により聴力は暴露後 12 時間を最大 ( $73.6 \pm 14.4$  dB SPL) とし 24 時間後に軽減する一過性閾値上昇と、14 日後での永続的閾値上昇 ( $40.0 \pm 13.8$  dB SPL) を認めた。Phospho- MEK1/ ERK1/2 /P90 RSK は各々発症後 3-6 時間をピークとする約 2 倍から 3 倍の増加を認めた。Total- MEK1/ ERK1/2 /P90 RSK はコントロール（暴露前）の  $100 \pm 20\%$  にとどまっていた。Phospho-JNK は 3 時間後、48 時間後をピークとして 1.8 倍に達する増加を示した。Phospho- および Total-c-Jun は発症後 3 時間、12 時間をピークとする増加を認めた。Phospho-p38MAPK は 48 時間後に 2 倍の増加を認め、Total-p38MAPK も 48 時間後に増加していた。免疫染色では 3 時間後にらせん靭帯、感覚上皮で p90 RSK の発現をみとめた。3 時間後の JNK の発現部位はらせん靭帯、感覚上皮、らせん神経節であった。暴露後 48 時間後では JNK, p38 MAPK の発現をらせん神経節で認めた。

## 考察

MEK1/ ERK1/2 /P90 RSK カスケードについては、らせん神経節と感覚上皮に騒音暴露後 3-6 時間をピークに活性化を認めた。この際 Total-MEK1/ ERK1/2 /P90 RSK には増加を認めず、一時的なリン酸化によるもので蛋白合成を伴わないものと考えられた。以上の MEK1/ ERK1/2 /P90 RSK 活性化は音響暴露に対して保護的に作用すると考えられる。JNK, p38 MAPK については 48 時間後のらせん神経節での遅発性活性化を認めた。JNK, p38MAPK はアポトーシスを誘導する分子である。

## 結論

騒音暴露後、一過性閾値上昇と一致して MEK1/ ERK1/2 /P90 RSK の活性化をみとめたほか、暴露後 48 時間後のらせん神経節では JNK, p38 MAPK の活性化も認めた。

## 研究発表

### 1. 論文発表

1) A commentary on 'TECTA mutations in Japanese with mid-frequency hearing loss affected by Zona Pellucida domain protein secretion' Maeda Y, Fukushima K. J Hum Genet. 2012. 57(10):619-20.

2) Cochlin-tomoprotein (CTP) detection test identified perilymph leakage preoperatively in revision stapes surgery. Kataoka Y, Ikezono T, Fukushima K, Yuen K, Maeda Y, Sugaya A, Nishizaki K. Auris Nasus Larynx. 2012 Oct 17

### 2. 学会発表

日本耳科学会総会 平成 24 年 10 月 4-6 日、名古屋市

## 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案取得

なし

### 3. その他

なし

## 難治性内耳疾患の遺伝子バンク構築

### 突発性難聴の遺伝子相関解析

分担研究者：宇佐美 真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：鬼頭 良輔（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：西尾 信哉（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：工 穰（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

突発性難聴は特定疾患（難病）に含まれ、患者の QOL を著しく低下させるため疾患の克服が期待されている。従来から種々のアプローチにより研究がなされているが、未だにメカニズムをはじめ不明な点が多いのが現状である。

本研究では、「急性高度難聴に関する調査研究班」および「前庭機能異常に関する調査研究班」の各施設との共同研究として難治性内耳疾患について遺伝子バンク構築を行うとともに、過去に突発性難聴との関連が報告された遺伝子、病態として推測される循環障害などへの関与が報告されている遺伝子等との遺伝子関連解析を実施した。その結果、*SOD1* 遺伝子の関与が示唆される結果が得られた。また遺伝子バンクに集積された臨床データについても併せて解析を実施した。

### 研究目的

突発性難聴は特定疾患（難病）に含まれ、患者の QOL を著しく低下させるため疾患の克服が期待されている。

これらの疾患に関して、従来から種々のアプローチで研究されているにもかかわらず、未だ発症メカニズムは不明である。本研究では、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫に加え、急性低音障害型感音難聴および良性発作性頭位めまい症を対象に、原因の特定、発症メカニズムの解明等の

基礎研究の推進に必要な遺伝子バンクを構築し、それらの疾患の発症メカニズムを解明することを目的としている。今回我々は、上記遺伝子バンクプロジェクトで集積されたサンプルをもとに、分譲手法（特に全ゲノム増幅法の有効性）に関する検討を実施した。

予備的解析として、分譲用のサンプルが解析に十分なクオリティを有することを確認することを目的に、過去に突発性難聴との関連が報告された遺伝子、脳梗塞・循環器障害への関与が報告されてい

る遺伝子等との遺伝子関連解析を実施した。

また本遺伝子バンクではサンプルの臨床データの集積もかねており、今回は臨床データと遺伝子多型の関連性についてもあわせて解析を行い、有用性を検討した。

## 研究方法

### (1) 遺伝子バンク構築

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「急性高度難聴に関する調査研究班」、「前庭機能障害に関する調査研究班」の研究代表者および研究分担者の所属する機関（全国 23 施設）との共同研究により、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫に加え、急性低音障害型感音難聴および良性発作性頭位めまい症患者の遺伝子および臨床データの収集を行った。収集された遺伝子は GenomiPhi v2 (GE healthcare bio) を用いて全ゲノム増幅を行いサンプル分譲に備えた。

### (倫理面への配慮)

患者選定基準を満たす患者を対象に、十分な説明の上、書面で同意を得て臨床情報調査項目の調査・採血を行った。各研究機関においては、採血時に匿名化を行い個人情報保護に配慮を行った。

### (2) 遺伝子相関解析

分譲用のサンプルが解析に十分なクオリティを有することを確認することを目的

に、集積されたサンプルの一部を用いて、過去に突発性難聴との関連が報告された遺伝子、脳梗塞・循環器障害への関与が報告されている遺伝子多型 (SNP) との遺伝子関連解析を実施した。SNP の解析には Applide Biosystems 社の Taq Man Genotyping Assays および Step One Plus 装置を用いた。また解析ではアレル頻度を基に  $\chi^2$  検定を実施した。

### (3) 臨床データの利用

上記遺伝子相関解析の結果、有意差のあった SOD1 遺伝子の 2 遺伝子多型について、突発性難聴の臨床像（重症度・耳鳴やめまいの有無・治療効果）との関連性を検討した。

## 研究結果

### ① 遺伝子バンクの構築について

2013 年 1 月現在までに、本遺伝子バンクに集積されたサンプル数は 230 に達した。当該領域の遺伝子バンクとしては文献報告などを参考にした結果、世界でも最大規模のバンクと考えられた。

### ② 遺伝子相関解析

予備的解析として実際に集積されたサンプルの一部を利用して、突発性難聴患者 192 名を対象に候補遺伝子相関解析を行った。コントロールとしては GWAS Database

(<https://gwas.lifesciencedb.jp/cgi-bin/gwasdb/startJ.cgi>) を用い、アレル頻度について比較を行った。



その結果 SOD1、PRKCH 遺伝子ではアレル頻度に有意差を認めた（表1）。一方、過去に突発性難聴との関連が報告されていた MTHFR、NOS3、LTA 遺伝子などでは差を認めなかった。2次解析として、信州大学で収集した聴力正常で突発性難聴等の耳疾患の既往ない成人のコントロールのデータベースとの間で SOD1、PRKCH 遺伝子に関して解析を行ったところ、SOD1 遺伝子のみ有意差を認める結果であった（表2）。

### ③臨床データの利用

遺伝子バンクに収集されたサンプルのうち 209 名までについての臨床データの解析は、昨年度に報告した。今回は SOD1 遺伝子の関連解析に用いた 2 遺伝子多型について、遺伝子型と突発性難聴の重症度（Grade 分類）・耳鳴の有無・めまいの有無・治療効果判定の関連性について統計学的に解析した。

結果として rs4998557 多型については Garde3-4 の重症例や耳鳴のある症例について、より発症への関連性が示唆される結果となった（表3）。また rs1041740 多型については、コントロールとの間に有意差は認めなかったが、解析対象内においては、重症度と遺伝子型に関連性が示唆される結果であった。

### 考察

SOD1（Superoxide dismutase 1）遺伝子は酸化ストレス応答の遺伝子として報告されており、主に、活性酸素の処理に関

連する遺伝子として報告されている。内耳の障害に酸化ストレス応答が関連している可能性は動物モデル等では示されているが、突発性難聴との関連に関する報告はないため、更なる解析が必要だと考えられる。

### 結論

難治性内耳疾患のメカニズムの解明を目的に遺伝子バンクの構築を継続して実施するとともに、収集された遺伝子を基に予備的な遺伝子解析を実施した。今後の継続により更なるサンプルの収集と遺伝子解析の成果が期待される。

### 健康危険情報

なし

### 研究発表

日本聴覚医学会 2012（学会発表・京都）

### 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 遺伝子関連解析の結果（ケース 192 名・コントロール 110 名程度）

遺伝子名	rs number	アレル頻度(症例)	アレル頻度(コントロール)	P値	オッズ比
SOD1	rs4998557	215(56.0%) : 169(44.0%)	103(45.6%) : 123(54.4%)	0.01	1.52(1.09-2.11)
	rs1041740	270(70.7%) : 112(29.3%)	137(60.6%) : 89(39.4%)	0.01	1.57(1.11-2.21)
PRKCH	rs2230500	263(81.7%) : 59(18.3%)	221(98.7%) : 3(1.3%)	< 0.01	16.5(6.76-40.3)

表2 信州大学コントロールとの間の遺伝子関連解析（ケース 192 名・コントロール 300 名程度）

SOD1 (rs4998557)	遺伝子型		総計
	AA	AG+GG	
症例群	63	129	192
信大コントロール	69	214	283
	132	343	475

p=0.044 Odds ratio: 1.51(1.01-2.27)

表3 SOD1 遺伝子多型と臨床データの関連性の検討

		major homo	hetero	minor homo	信大コントロールとの相関解析(p値)		
					アレル頻度解析	優性遺伝モデル	劣性遺伝モデル
発症時平均年齢(歳)		56.6±13.6	56.8±14.6	54.9±15.3	-	-	-
Grade分類	1-2	10	24	9	0.94	0.96	0.87
	3-4	44	49	25	0.09	0.99	0.01
耳鳴	あり	53	69	32	0.13	0.91	0.03
	なし	3	14	4	0.61	0.81	0.29
めまい	あり	20	34	14	0.55	0.91	0.39
	なし	33	48	20	0.24	0.77	0.1
治療効果	著明回復以上	17	28	14	0.85	0.67	0.48
	回復以下	32	49	21	0.35	0.9	0.17

## 難聴患者におけるミトコンドリア遺伝子変異の網羅的解析に関する研究

分担研究者：宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：矢野卓也（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：西尾信哉（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

難聴患者におけるミトコンドリアDNA (mtDNA) 遺伝子変異の頻度を調べることを目的とした。母系遺伝形式を取る患者群254名とランダム家系群（母系遺伝家系9名、常染色体優性遺伝家系21名、常染色体劣性遺伝家系または孤発例131名、家系図不明31名）の192名、計446名を対象とし、ミトコンドリア遺伝子全領域をシーケンスし、文献上報告のある難聴関連変異の頻度及び新規変異について検討を行った。母系遺伝家系群では24%に、ランダム家系群では12%に難聴関連変異が認められた。変異の中で最も多かったのは1555A>G変異（24例）、次いで827A>G変異（11例）、3243A>G変異（9例）の順であった。また、今までに報告のない難聴関連変異も10種類認められた。

### 研究目的

ミトコンドリア DNA (mtDNA) 遺伝子変異による難聴は母系遺伝形式をとる遺伝性難聴として多数報告されている。ミトコンドリア難聴に関する報告されている遺伝子変異は 1555A>G、3243A>G、7445A>G、8296A>G など現在までに 92 種類が知られている。これらの遺伝子変異のうち 4 変異については平成 24 年より保険収載されているインベーター法による網羅的なスクリーニングにより診断が可能になった。一方、病的意義が明らかになっていない変異も数多く報告されており、また地域や民族によっても mtDNA 多型が異なるため、同定された遺伝子変異が病的変異であるかど

うか結論付けるのは容易ではない。そこで今回、我々は日本人難聴者の mtDNA 全領域シーケンスを行い、既知の難聴関連遺伝子変異の頻度を検討するとともに新規の難聴関連 mtDNA 遺伝子変異を同定することを目的とした。

### 研究方法

日本人難聴患者446名を対象とした。家系図から母系遺伝形式をとる遺伝性難聴患者254名、ランダム家系群の192名を対象とし、直接シーケンス法を用いてmtDNA全領域シーケンスを行い、ミトコンドリア遺伝子変異の同定を行った。財団法人岐阜県国際バイオ研究所が管理するミトコン

ドリアゲノム多型データベース (mtSNPデータベース)、MITOMAPデータベース、ウプサラ大学ミトコンドリアデータベースに基づき既知の難聴関連遺伝子変異および新規の遺伝子変異を同定した。

## 研究結果

難聴に関連した報告のある変異は19種類認められた。(表1) 1555A>G変異が24名、3243A>G変異が9名、7511T>C変異が4名に認められた。他に難聴関連変異として既に報告のある変異を含めると母系遺伝家系群では24%にミトコンドリア難聴関連変異が認められた。母系遺伝家系群とランダム家系群とを比較すると前者に高頻度に変異がみとめられた。

データベースにて報告のない10種類の多型が検出され、そのうち2つの多型が新規難聴関連変異候補として同定された。(表2)

## 考察

今回の検討において、母系遺伝家系254名でのミトコンドリア遺伝子変異頻度は全体の24%と高く、ランダム家系群188名では12%であったことを比較すると母系遺伝家系ではミトコンドリア変異の頻度が高いことが難聴患者の重要な原因であることが推測された。変異のうち1555A>G

### 2. 実用新案登録

なし

変異、3243A>G変異の頻度が高いことが明らかとなった。

新規難聴関連候補としての多型が10種類見出された。これらは難聴者から見出された多型であり、ミトコンドリア機能に何らかの機能的影響を及ぼしている可能性が示唆された。

## 結論

難聴患者、特に母系遺伝形式を呈する難聴家系では1555A>G変異、3243A>G変異が多く、重要な原因遺伝子変異であることが確認された。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

矢野卓也、他：ミトコンドリア遺伝子全領域シーケンスによる難聴の遺伝子解析. 第22回日本耳科学会総会・学術講演会(名古屋)

## 知的財産権の出願、登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 3. その他

なし

表1 難聴患者における既知の難聴関連ミトコンドリア変異

アレル	疾患	症例		
		全体 (n=446)	母系家系群 (n=254)	ランダム家系群 (n=192)
C792T	難聴のリスク増加因子	1	1	-
A827G	難聴	11	5	6
A856G	レーバー遺伝性視神経萎縮症の促進/アルツハイマー病/難聴関連	3	3	-
T961C	難聴, 左室心筋緻密化障害の可能性	3	3	-
T1005C	難聴	2	1	1
T1095C	感音性難聴	1	1	-
C1310T	難聴関連	3	-	3
C1494T	難聴	1	-	1
A1555G	難聴	24	22	2
A3243G	糖尿病/感音性難聴 / 巣状分節性糸球体硬化症 / 心臓+多臓器不全	9	9	-
T3398C	糖尿病/難聴の可能性/肥大型心筋症の可能性 / 左室心筋緻密化障害の可能性	1	1	-
G3421A	糖尿病/難聴	2	1	1
T5628C	慢性進行性外眼筋麻痺 / 難聴促進	1	1	-
T7511C	感音性難聴	4	3	1
A8108G	感音性難聴	1	1	-
A8348G	心筋症 / 感音性難聴 / 高血圧要因の可能性	1	-	1
G11696A	レーバー遺伝性視神経萎縮症/難聴/高血圧促進	4	-	4
A14693G	MELAS(ミトコンドリア脳筋症)/レーバー遺伝性視神経萎縮症/難聴/高血圧促進	1	-	1
G15927A	多発性硬化症 / 難聴(1555変異の浸透率増加)	4	1	3

表2 難聴患者における新規ミトコンドリア変異

アレル	変異	塩基保存率 (/61)	塩基保存率 (%)	アミノ酸変化	アミノ酸保 存率 (/61)	アミノ酸保存率 (%)	遺伝形式	聴力レベル
16S rRNA	T2069C	16	31.4	-	-	-	母系	高音漸減型
	T2285C	22	43.1	-	-	-	母系	高音漸減型
	T2285G	22	43.1	-	-	-	ランダム	皿型
	T2634C	34	66.7	-	-	-	ランダム	聾型
ND1	A3595G	-	-	Asn>Asp	54	88.5	母系	高音漸減型
COI	A6204G	-	-	Ser>Gly	61	100	母系	高音漸減型
ATPase6	A9124G	-	-	Thr>Ala	59	96.7	ランダム	一側性
ND4L	G10680A	-	-	Ala >Thr	59	96.7	ランダム	不明
ND5	A13153G	-	-	Ile >Val	35	57.4	ランダム	高音漸減型
Cytb	G15003C	-	-	Gly >Ala	61	100	ランダム	聾型

## 突発性難聴患者における酸化ストレスに関連する遺伝子多型の検討

分担研究者： 中島 務 (名古屋大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 寺西正明 (名古屋大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 内田育恵 (愛知医大耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 西尾直樹 (名古屋大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 加藤 健 (名古屋大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 大竹宏直 (名古屋大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 吉田忠雄 (名古屋大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 鈴木宏和 (名古屋大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 曾根三千彦 (名古屋大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者： 杉浦彩子 (国立長寿医療研究センター)  
共同研究者： 安藤富士子 (淑徳大学)  
共同研究者： 下方浩史 (国立長寿医療研究センター)

### 研究要旨

突発性難聴の病態は不明であるが、その病態解明に、近年遺伝子多型の検索が行われるようになった。また突発性難聴と酸化ストレスとの関連も示唆される。今回、突発性難聴患者とコントロールで酸化ストレスに関連する遺伝子多型について解析した。名大病院で突発性難聴と診断された84名(一部の検討は83名)をケース群とし、国立長寿医療研究センター『老化に関する長期縦断疫学研究』第1次調査に参加した一般地域住民2107名(一部の検討は2048名)をコントロール群として比較した。*GPXI*(rs1050450), *PON1*(rs662), *PON1*(rs854560), *PON2*(rs7493), *SOD2*(rs4880), *NOS3*(rs1799983), *MTHFR*(rs1801133), *MTHFR*(rs1801131)の一塩基多型(SNP)を調べた。多重ロジスティック回帰分析にて、*NOS3* 894T アレルは調整変数を入れない model 1、年齢、性別を調整変数にしたモデル2ともに、突発性難聴リスクを有意に上げていた。他、7つ多型ではコントロールと差は認めなかった。

### 研究目的

これまで当科では、突発性難聴の約3分の1の症例が、MRIで内耳血管透過性の亢進もしくは血液迷路関門の破綻を示すことを報告してきた。酸化ストレスは毛細血管の障害に関連する。諸家の報告か

ら突発性難聴の病態にも酸化ストレスの関与が指摘されている。今回は酸化ストレスに関連する8つの遺伝子多型について突発性難聴のリスクに関する検討をおこなった。

## 方法

### 患者

2007年11月から2011年3月の間に名大病院耳鼻咽喉科を受診し、突発性難聴と診断された84人の患者(38人男性、46人女性、年齢58.2歳(22-86))を対象とした。コントロールは、名大病院の診療圏にある国立長寿医療研究センターにおける老化に関する長期縦断疫学研究、(NILS-LSA)に参加した人たちである。この人たちの中に33人が突発性難聴の既往ありと答えていたので、この33人を除外し2107名をコントロールとした。なお、*NOS3* (rs1799983), *MTHFR* (rs1801133), *MTHFR* (rs1801131)については、突発性難聴患者83名、コントロール2048名で検討した

### 倫理面への配慮

研究プロトコルは、名古屋大学の倫理委員会(370-4)および国立長寿医療センターの倫理委員会(#14、#52、#74)によって承認され、その方針にしたがって行った。

### 遺伝子型解析

酸化ストレスに関連する *GPX1*(rs1050450), *PON1* (rs662), *PON1* (rs854560), *PON2* (rs7493), *SOD2* (rs4880), *NOS3* (rs1799983), *MTHFR* (rs1801133), *MTHFR* (rs1801131)の8つの遺伝子多型を調べた。

### 統計分析

これらの分析では、ふたつのモデルを使用した。モデル1では調整変数なし、

モデル2では年齢、性を調節変数とした。相加モデルを用い、多重ロジスティック回帰分析にてオッズ比を算出した。

## 研究結果

コントロール群と突発性難聴群に有意な年齢、性の差は認めなかった。コントロール群より突発性難聴群において、糖尿病の既往が高かった( $p < 0.01$ )。8つのSNPの中の遺伝子多型配列を表1に示す。*NOS3* (rs1799983)では、*NOS3* 894T アレルは突発性難聴のリスクを有意に高めることがわかった。(オッズ比は、モデル2にて 2.108 (95%の信頼区間 [CI]1.343-3.309)。

## 考察

*NOS3* は蝸牛に発現しており、イタリアでも *NOS3* G894T 遺伝子多型が突発性難聴のリスクを高めることが報告されている。NOは、血管内皮より産生され血管拡張に重要な役割を果たす。血管内皮型 NOS (eNOS, *NOS3*)の遺伝子多型によりNOの産生が少なくなると赤血球変形能に影響を与え血液の粘稠度が増す可能性がある (Clinical haemorheology and microcirculation Mannini L, et al Ann Ist Super Sanita 2007)。

## 結論

*NOS3* G894T(rs1799983)は、突発性難聴のリスクに関連することが示唆された。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録情報

なし

学会発表

Teranishi et al:Inner Ear Biology 2012

論文発表

Polymorphisms in genes involved in oxidative stress response in patients with sudden sensorineural hearing loss and Ménière's disease in a Japanese population.

(Teranishi et al, DNA Cell Biol, 2012 Oct;31(10):1555-62. Epub 2012 Aug 9.)



**表 1. *GPXI* (rs1050450), *PONI* (rs662), *PONI* (rs854560), *PON2* (rs7493), *SOD2* (rs4880), *MTHFR* (rs1801133), *MTHFR* (rs1801131), *NOS3*(rs1799983) の遺伝子型分布。**

遺伝子型	Controls	SSNHL patients	<i>p</i> -value (vs controls)
	Total no. = 2107, 2048 no. (%)	Total no. = 84, 83 no. (%)	
<i>GPXI</i> (rs1050450)			
CC	1782 (84.6)	71 (84.5)	0.4351
CT	318 (15.1)	12 (14.3)	
TT	7 (0.3)	1 (1.2)	
<i>PONI</i> (rs662)			
GG	928 (44.0)	34 (40.5)	0.3891
GA	952 (45.2)	37 (44.1)	
AA	227 (10.8)	13 (15.5)	
<i>PONI</i> (rs854560)			
AA	1820 (86.4)	78 (92.9)	0.1615
AT	271 (12.9)	5 (6.0)	
TT	16 (0.8)	1 (1.2)	
<i>PON2</i> (rs7493)			
CC	1375 (65.3)	59 (70.2)	0.4596
CG	631 (30.0)	20 (23.8)	
GG	101 (4.8)	5 (6.0)	
<i>SOD2</i> (rs4880)			
TT	1595 (75.7)	60 (71.4)	0.3929
TC	460 (21.8)	23 (27.4)	
CC	52 (2.5)	1 (1.2)	
<i>MTHFR</i> (rs1801133)			
CC	780 (38.1)	33 (39.8)	0.8191
TC	957 (46.7)	36 (43.4)	
TT	311 (15.2)	14 (16.9)	
<i>MTHFR</i> (rs1801131)			
AA	1329 (64.9)	54 (65.1)	0.1740
AC	641 (31.3)	29 (34.9)	
CC	78 (3.8)	0 (0)	
<i>NOS3</i> (rs1799983)			
GG	1756 (85.7)	60 (72.3)	0.0032
GT	280 (13.7)	22 (26.5)	
TT	12 (0.6)	1 (1.2)	

*GPXI* (rs1050450), *PONI* (rs662), *PONI* (rs854560), *PON2* (rs7493), *SOD2* (rs4880)は、control=2107, SSNHL patients=84。 *MTHFR* (rs1801133), *MTHFR* (rs1801131), *NOS3*(rs1799983)は、control=2048, SSNHL patients=83 での検討である。

## 老人性難聴における遺伝子変異の検索

—当科での現況と今後—

分担研究者：佐藤宏昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：大塚尚志（岩手医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：嶋本記里人（岩手医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：福田宏治（岩手医科大学耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

160名（老人性難聴者78名、健聴高齢者82名）を対象としたSirt3遺伝子のSNPs解析の結果、rs4758633多型が高音域の聴力障害と関連していることが示唆され、今後はミトコンドリアにのみ局在するSirt3、Sirt4、Sirt5に焦点を絞り、フルゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析を行う予定である。

### 研究目的

Sirt3遺伝子多型の聴力との関連について、65歳以上の難聴者と健聴者を対象にSirt3遺伝子多型を解析し、特異的な遺伝子多型の検討を行った。

### 研究方法

65歳以上の高齢者、男性67名、女性93名、計160名、平均年齢75.8歳(65-92歳)を対象として、聴力検査、ならびに末梢血液検体から遺伝子を抽出し解析した。

同検体よりFree Radical Analysis System、FRAS4を用いて酸化ストレス度、抗酸化力を測定する。

（倫理面への配慮）

岩手医科大学倫理委員会の承認を得た文書を用い、本研究に同意を得られた方を対象とした。

### 研究結果

健聴群に比し難聴群に有意に多く認め

られたSirt3遺伝子多型は3か所認められた（rs12226402, rs12226697, rs4758633）。また既存のミトコンドリア遺伝子データを含めて解析したところ、重回帰分析、多重ロジスティック解析にて、高音部領域でSirt3遺伝子多型の1つに、また低音部領域ではミトコンドリア遺伝子ではA3434Gと961insCに統計学的に有意差を認めた。なお、FRAS4による測定は諸事情により今回結果はまだ得られていない。

### 考察

今回我々は老人性難聴者においてSirt3遺伝子多型を検出した（rs12226402, rs12226687, rs4758633）。その中でrs12226402とrs12226687はコード領域に位置していた。一方、臨床像を併せた解析では、重回帰分析、多重ロジスティック解析にてSirt3遺伝子のrs4758633に統計学的有意差を認めた。また低音部領域ではミトコンドリア遺伝子の

961insC と A3434G に有意差を認め難聴に関連する可能性が考えられた。

なお、今後の展望として、ミトコンドリアにのみ局在する Sirt3、Sirt4、Sirt5 に焦点を絞り、フルゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析を行う予定である。併せて FRAS4 による加齢における酸化ストレス度、抗酸化力を測定し、遺伝子多型情報、聴力を含めた臨床像項目、を統合的に解析していく予定である。

#### 結論

今回、ヒトでの老人性難聴における Sirt3 遺伝子多型を検索した。Sirt3 遺伝子の rs4758633 多型が高音域の聴力障害と関連していることが示唆された。

#### 研究発表健康危険情報

なし

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shimamoto K, Ohtsuka H, Nakayashiki N: Sequence variation at position 961 of the mitochondrial 12S rRNA gene in patients with presbycusis. Iwate Med Assoc 63(5):263-269, 2011

##### 2. 学会発表

1) Ohtsuka H, Shimamoto K, Shiga K, Sato H: Polymorphic analysis of Sirt3 gene in Presbycusis. 2012. The First Asian Otology Meeting & The 3rd East Asian Symposium on Otology, Nagasaki, Japan.

2) 大塚尚志, 桑島 秀, 福田宏治, 佐藤

宏昭: 老人性難聴における Sirt3 遺伝子多型の検索. 第22回日本耳科学会総会・学術講演会, 名古屋

#### 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 東京医科歯科大学における原田病症例の聴平衡覚所見

分担研究者：喜多村 健（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者：西尾 綾子（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者：野口 佳裕（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者：高橋 正時（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者：戸叶 尚史（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者：山本 桂（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者：吉本 亮一（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者：澤田 光毅（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）  
共同研究者：高瀬 博（東京医科歯科大学眼科）  
共同研究者：宮永 将（東京医科歯科大学眼科）  
共同研究者：望月 學（東京医科歯科大学眼科）

### 研究要旨

原田病症例 45 例 86 耳に対して、聴覚・平衡覚所見を検討した。初診時、33 例（73%）に聴力レベル低下を、13 例（29%）に眼振を認めた。長期経過観察しえた 18 例 34 耳において、5 耳（15%）で難聴が不変であり、1 耳（3%）で難聴が変動していた。また、1 例（7%）でめまいと眼振が残存していた。今後、眼科との共同研究として、長期の経過観察を行い、さらなる検討を進める予定である。

### 研究目的

Vogt-小柳-原田病（以下、原田病）では、ぶどう膜炎発症に前後して、難聴、めまいなどの聴平衡覚障害を合併することが知られている。原田病発症早期の聴平衡覚障害については過去に多数の報告があるが、長期的な予後についての報告は少ない。原田病症例に対して、長期の経過観察を行えた例を中心に、聴平衡覚障害の予後について検討を行った。

### 研究方法および倫理面への配慮

1999 年 1 月から 2012 年 3 月に東京医科歯科大学眼科で診断された原田病症例 92

例中、聴平衡覚の精査目的に当科を受診したものは 63 例であった。このうち診療録が確認可能であったのは 47 例であった。騒音性難聴（1 例 2 耳）、中耳炎術後状態（5 例 6 耳）を除外した 45 例 86 耳を対象とした。病歴、聴覚所見、平衡覚所見を診療録から retrospective に検討した。対象とした 45 例の内訳は、男性 11 例、女性 34 例で、当科初診時年齢は 18 歳～78 歳（平均 47.8 歳）であり、当科外来における経過観察期間は 0 カ月～158 カ月（平均 22.1 カ月）であった。経過観察期間が 1 カ月以内であったものが 19 例 36 耳、12 カ月以上であったものが 18 例 34 耳であ